



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CLAUDIO CÉSAR MONTENEGRO JÚNIOR

ANÁLISE DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM SETE
ACESSOS DE *Citrus*

AREIA – PB
FEVEREIRO DE 2017

CLAUDIO CÉSAR MONTENEGRO JÚNIOR

**ANÁLISE DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM SETE
ACESSOS DE *Citrus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Dra. Ana Emília Barros e Silva

**Areia - PB
Fevereiro de 2017**

Claudio César Montenegro Júnior

**ANÁLISE DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA HETEROCROMATINA EM SETE
ACESSOS DE *Citrus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____de ____2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Emília Barros e Silva (UFPB/DCB)
(Orientador)

Prof. Msc. Enoque Medeiros Neto (UFPB/DCB)
(Examinador)

Msc. Joel Maciel Pereira Cordeiro (PPGA/UFPB)
(Examinador)

**AREIA - PB
FEVEREIRO - 2017**

Dedico este trabalho ao meu querido pai Claudio,
que sempre sonhou com este momento.

A você meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

a Prof. Ana Emília Barros e Silva que sempre foi uma orientadora e professora muito atenciosa, compreensiva, dedicada e, acima de tudo, uma amiga que me fortaleceu nos momentos mais difíceis dessa jornada, obrigado por ser essa pessoa maravilhosa, sem você esse trabalho não seria possível;

a minha mãe Gerlane e ao meu falecido pai Claudio, que desde sempre me amaram de forma incondicional durante todos meus anos de vida, sempre estando ao meu lado em todos os momentos, me incentivando para que eu conseguisse ingressar na vida acadêmica e tornando meu sonho uma realidade. Vocês são meus pilares dessa vida, muito obrigado por tudo;

aos meus amigos de laboratório Angeline, Sibelle, Joel, Sarah, Enoque, Felipe, Lânia, Achilles, Amanda, Jéssica, Maria Clara, Saulo, Luciana, Bruno, Carem e Ingrid, que sempre foram muito prestativos e companheiros, colaborando para que meu trabalho se concluísse e tornando o dia a dia de trabalho mais alegre e leve;

aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas de 2012.1, em especial Bruna, Jayene, Sammara, Joelson, Maiara, Emanuel, Ciro e Edardna pelo companheirismo, espírito de equipe,

dedicação, compreensão, esforço e amor que sempre cercou a nossa turma e que tornou possível a conclusão dessa etapa da minha vida;

aos professores do curso de Ciências Biológicas, em especial David Holanda, Carlos Henrique, Laís Borges, Mailson do Rêgo, Núbia Costa, Péricles e Daniel Duarte, que me inspiraram e motivaram durante minha jornada na graduação;

aos secretários da coordenação do Curso de Ciências Biológicas do CCA, Delza e Eduardo, que sempre foram muito prestativos e atenciosos com todos;

aos meus queridos amigos Amabile, Lucas, Amanda, Ingrid, João Paulo, Stephanie, Harrison, Mateus e Arthur que sempre me apoiaram, incentivaram e me deram forças para que eu conseguisse concluir essa etapa tão importante na minha vida;

ao programa PIBIC/CNPq da UFPB que financiou esse projeto durante três anos.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
HETEROCROMATINA	10
GÊNERO <i>Citrus</i>	12
CITOGENÉTICA DE <i>Citrus</i> E GÊNEROS RELACIONADOS.....	14
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
TABELAS	28
LISTA DE FIGURAS	29

RESUMO

A heterocromatina foi considerada como “lixo genético” por muitos anos, até que estudos indicassem suas propriedades e funções no genoma. Em gêneros como *Citrus*, que possui todas as espécies com $2n=18$ e altos índices de híbridos, a heterocromatina é usada em estudos citogenéticos para caracterizar e diferenciar as espécies de acordo com a distribuição de bandas heterocromáticas. O trabalho objetivou analisar sete acessos de *Citrus* por sua distribuição heterocromática. Os acessos foram analisados por CMA/DAPI e classificados de acordo com os tipos de cromossomos que são encontrados nas espécies de *Citrus*. Todas as espécies mantiveram o padrão de $CMA^+/DAPI^-$ nas bandas heterocromáticas, onde todos os oito tipos de cromossomos foram encontrados. Houveram espécies com cariótipos muito semelhantes como em *C. hystrix* e *C. longispina*, *C. iwaikan* e *C. kamikan*, e outras que se distinguiram das demais (*C. natsukiu*, *C. taiwanica* e *C. webberi*), mas no geral todos apresentaram fórmulas cariotípicas diferentes. Cada acesso apresentou particularidades em cromossomos específicos, como o heteromorfismo de bandas (bandas maiores ou menores que outras), bandas parcialmente descondensadas, etc. O heteromorfismo de banda e falta de pares de cromossomos homólogos, podem indicar que esses acessos são todos de origem híbrida. A partir das fórmulas cariotípicas foi possível fazer uma ligação parental dos acessos com os possíveis parentais puros, entretanto análises através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com outros marcadores citotaxonômicos são necessárias para confirmar essa hipótese. As análises mostram que todos os acessos são ótimos modelos para estudos evolutivos dentro do grupo *Citrus*.

Palavras-chave: Identificação de possíveis híbridos, Citogenética molecular, Regiões heterocromáticas

ABSTRACT

Heterochromatin was considered as "junk DNA" for many years, until studies indicated its properties and functions in the genome. In genera such as *Citrus*, which has all species with $2n = 18$ and high hybrid indexes, heterochromatin is used in cytogenetic studies to characterize and differentiate species according to the distribution of heterochromatic bands. The objective of this work was to analyze seven accessions of *Citrus* by their heterochromatic distribution. The accesses were analyzed by CMA/DAPI and classified according to the types of chromosomes that are found in *Citrus* species. All species maintained the CMA⁺/DAPI⁻ pattern in heterochromatic bands, where all eight types of chromosomes were found. There were species with a very similar karyotype such as *C. hystrix* and *C. longispina*, *C. iwaikan* and *C. kamikan*, and others that were distinguished from the others (*C. natsukiu*, *C. taiwanica* and *C. webberi*), but in general all presented different karyotypes formulas. Each access presented particularities on specific chromosomes, such as heteromorphism of bands (larger or smaller bands than others), partially decondensed bands, etc. Band heteromorphism and lack of pairs of homologous chromosomes may indicate that these accessions are all of hybrid origin. From the karyotype formulas it was possible to make a parental connection of the accessions with the possible pure parental. However analyzes using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) others cytotaxonomic markers are necessary to confirm that hypothesis. The analyzes show that all accesses are great models for evolutionary studies within the *Citrus* group.

Keywords: Identification of possible hybrids, Molecular cytogenetics, Heterochromatic regions

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

HETEROCROMATINA

A heterocromatina vem sendo estudada desde o século XIX, quando ainda não se tinha certeza do significado dessa estrutura no material genético. Inicialmente se compreendia que esses segmentos de cromatina eram sequências repetitivas de DNA que coravam com mais vigor do que os outros segmentos, possuindo uma forma bastante condensada no núcleo celular mitótico dos eucariontes (Brown, 1966). No século XX, Heitz (1928) propôs que a cromatina pode ser de dois tipos: a heterocromatina, que se mantinha condensada durante todo o período do ciclo celular, e a eucromatina, que apresentava alternância de condensação e não condensação durante o ciclo celular. Estudiosos acreditavam que a heterocromatina era um “lixo genético”, que se acumulava durante a evolução e que não tinha atividade gênica ou utilidade nos processos do genoma (Henning, 1999). Porém, anos mais tarde, os citologistas descobriram que as regiões heterocromáticas apresentavam propriedades diferenciais e úteis no genoma.

. No nível citológico, a heterocromatina encontra-se nos telômeros, nas regiões centrôméricas e pericentroméricas, em alguns cromossomos sexuais, entre outros (Avramova, 2002). A heterocromatina é classificada em heterocromatina constitutiva, que geralmente permanece fixa nesse estado em um local cromossômico e a heterocromatina facultativa, que pode variar de heterocromatina para eucromatina de acordo com cada processo. A heterocromatina constitutiva é formada por DNA satélite, geralmente não apresentando genes. Já a heterocromatina facultativa pode apresentar genes e é encontrada em vários locais, como no cromossomo sexual X dos mamíferos, tendo a importância da desativação de um dos cromossomos X quando necessário. (Park & Kuroda, 2001). Em plantas e animais, por exemplo, a estrutura heterocromática é formada principalmente por elementos transponíveis e

por sequências repetitivas em tandem de DNA (DNA satélite), enquanto a estrutura eucromática é formada basicamente de genes.

Ao decorrer dos anos, muitos estudos pertinentes as regiões heterocromáticas vieram à tona com diversas considerações sobre suas propriedades estruturais e funcionais, assim como sobre sua localização específica no cariótipo das espécies. A citogenética foi uma ferramenta essencial para mostrar alguns fatos relacionados a regiões heterocromáticas. Havia um certo padrão de localização da heterocromatina nos cromossomos, onde geralmente se encontravam em regiões do centrômero, regiões terminais (telômeros), em RONS (regiões organizadoras do nucléolo), organizadas em blocos repetitivos (DNA Satélite), em cromossomos sexuais de algumas espécies (Avramova, 2002), e em cromossomos B de algumas espécies, como *Crepis capillaris* (Jamilena et al, 1994; Cheng e Lin, 2003).

Pesquisas mais recentes sobre a heterocromatina demonstram um importante papel na modulação da expressão gênica, na estrutura dos cromossomos, na especiação e evolução das espécies (Neves et al, 2005). Uma dessas pesquisas, por exemplo, aponta que transcrições abundantes da heterocromatina em células germinativas estão ligadas ao controle de elementos transponíveis (Creasey & Martienssen, 2010).

Ao decorrer dos anos, as técnicas de análise relacionadas a heterocromática foram se aperfeiçoando, gerando um maior interesse entre pesquisadores, onde os mesmos começaram a compreender melhor as estruturas heterocromáticas, aceitando a importância dessas estruturas para diversos estudos, como os estudos evolutivos ou de interesse citotaxonômico, por exemplo. Uma das principais técnicas utilizadas são: bandeamento C, localizando toda a heterocromatina presente no cariótipo (Guerra, 1985); percepção da replicação tardia de algumas regiões heterocromáticas (ver Pardue & Henning, 1990); bandeamento das regiões heterocromáticas a partir de fluorocromos, mostrando um padrão de distribuição da heterocromatina ricas em GC ou AT (ver Guerra et al, 2000); sítios de DNA ribossomal (45S e

5S) conservados durante a evolução, localizados em regiões heterocromáticas (ver Barros e Silva & Guerra, 2010).

Os blocos de heterocromatina são por muitas vezes usados para estudos evolutivos em diversos gêneros de plantas, como *Citrus* e *Poncirus*, onde se observa padrões de distribuição dessas estruturas (Guerra, 1993; Carvalho, *et al* 2005).

GÊNERO *Citrus*

A subfamília Aurantiodeae, pertencente à família Rutaceae Engl. é composta por 33 gêneros e cerca de 200 espécies, possuindo distribuição ampla mundialmente, mais especificamente em zonas tropicais e subtropicais (Swingle & Reece, 1967). Com bases em análises morfológicas e anatômicas, Carpenter e Reece (1969) dividiram a subfamília Aurantiodeae em duas tribos: a tribo Clauseneae, composta pelas subtribos Micromelinae, Clauseninae e Merrillinae, e a tribo Citreae composta pelas subtribos Triphasiinae, Citrinae e Balsamocitrinae. Citreae possui gêneros de interesse econômico como *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, tendo características semelhantes entre eles, com uma fraca barreira reprodutiva, frequentemente gerando híbridos entre esses gêneros, tornando-os taxonomicamente complexos (Guerra *et al.*, 2000). *Citrus* é um gênero que já foi bastante estudado ao longo dos anos, graças a sua importância econômica na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, além de servir como ornamentação (Webber, 1967; Guerra, 2009). A maioria dos representantes com frutas cítricas e de seus parentes selvagens são nativos do sudeste da Ásia, leste da Índia e norte da Austrália, porém sua distribuição é ampla em regiões tropicais e subtropicais (Swingle, 1967). Enquanto ao número de espécies desse gênero, existem sistemas de classificação que admitem três, 16 ou até 157 espécies para *Citrus* (Samuel *et al.*, 2001; De Araújo *et al.*; 2003).

As frutas cítricas estão em primeiro lugar no mundo no que diz respeito à produção de frutas. Elas são cultivadas em mais de 80 países ao redor do mundo, sendo que em 50 desses países o cultivo é comercial (Chang, 1992), onde desde 2001 o Brasil se encontra como o maior produtor e exportador de frutas cítricas em nível mundial (Xin, 2001) (Ministério da Agricultura do Brasil, 2017). A contribuição da indústria de *Citrus* para a economia mundial é enorme (estimado em mais de 10 milhões de dólares por ano) e fornece empregos para milhões de pessoas ao redor do mundo na colheita, manuseio, operações de transporte, de armazenamento e de marketing. A produção de *Citrus* registou um aumento considerável durante os anos 90 e chegando atualmente a 100 milhões de toneladas. Considerando o valor terapêutico destes frutos e a consciência geral de saúde entre o público, os *Citrus* têm importância em todo o mundo, e o consumo de fruta fresca é susceptível ao aumento (Ladaniya, 2008).

Citrus desempenha um importante papel na indústria farmacêutica, devido ao seu fornecimento de nutrientes das frutas, como a vitamina C, que possui indicações de consumo diário (Ladaniya, 2008). Os frutos possuem diversos fitoquímicos, que são de grande interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica, tais como: carotenoides (licopeno e B-caroteno), limonóides, flavanonas (naringins e turinoside), vitamina-B e outros complexos de nutrientes relacionados (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico / niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico, biotina, colina e inositol) (Filatova e Kolesnova, 1999).

Swingle (1967) dividiu gênero *Citrus* em dois subgêneros distintos: *Citrus* e *Papeda*; que são facilmente distinguidos pelas folhas, flores e características do fruto. Todos os representantes do subgênero *Citrus* possuem interesse econômico, apresentando vesículas de celulose, quase sem agregações densas de óleo e nunca contendo óleo azedo, causando assim um sabor agradável. Possuem folhas grandes ou pequenas, possuindo aroma agradável, e flores grandes e perfumadas (Webber & Batchelor, 1943). O gênero inclui alguns dos frutos mais importantes comercialmente no mundo, como Tangerina (*Citrus reticulata* Blanco), Laranja

doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), Toranja (*Citrus paradisi* Macf.), Limão (*Citrus limon* (L.) Burm f.) e Lima (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) (Hynniewta *et al*, 2014).

CITOGENÉTICA DE *Citrus* E GÊNEROS RELACIONADOS

A citogenética é uma ciência que vem auxiliando a identificação, bem como a caracterização genética de vários representantes da família Rutaceae (Guerra, 1983). A citogenética busca analisar os cromossomos de uma forma ampla, visando suas características mais marcantes como: tamanho, tipo morfológico etc. A análise citogenética é de extrema importância para gêneros como *Citrus* e gêneros relacionados, pois ambos possuem uma grande compatibilidade em seus padrões de tamanho, morfologia e tipo cromossômico e uma fraca barreira reprodutiva que permitem cruzamentos interespecíficos, com isso dificultando sua classificação (Guerra, 1993).

Os cromossomos de *Citrus* geralmente são bem pequenos, o que dificultou os trabalhos dos citogeneticistas no início, que usavam corantes acéticos e Giemsa para visualizar cromossomos mitóticos e meióticos. Tanto a técnica de Giemsa, como a técnica de coloração por corante acéticos, deixam em evidência a maior parte das regiões cromossômicas, até as regiões pouco densas (Guerra, 1982). Com o cromossomo praticamente todo corado, foi possível obter uma melhoria na contagem cromossômica desse gênero, onde apresentou um número constante de $2n = 18$, com exceção de alguns cultivares poliploides (Guerra, 1984). Um grande avanço na citotaxonomia surgiu com as análises da heterocromatina, onde o bandeamento C foi uma técnica bastante utilizada para localizar toda a heterocromatina constitutiva no cromossomo, o que auxiliou na caracterização citológica, bem como a distinção de algumas espécies de *Citrus* (Guerra, 1993).

Existem técnicas mais refinadas como a coloração cromossômica por fluorocromos, onde geralmente são usados a cromomicina A3 (CMA), que detecta zonas heterocromáticas ricas em guanina / citosina, e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que detecta zonas heterocromáticas ricas em adenina / timina (Guerra, 2000). Esse tipo de análise em *Citrus* tem permitido, por exemplo, apontar as possíveis espécies puras e as possíveis espécies de origem híbrida (Moraes et al., 2007). Os blocos heterocromáticos nos cromossomos de *Citrus* e gêneros relacionados, geralmente são compostos integralmente por guanina e citosina (GC), onde não são encontrados blocos heterocromáticos ricos em adenina e timina (AT), assim sendo classificado como CMA⁺ (positivo) / DAPI⁻ (negativo). Essa classificação quanto ao padrão de bandas heterocromáticas positivas, negativas ou neutras foi primeiro proposto por Guerra (1993), enquanto que a visualização e classificação dos tipos cromossômicos presentes em *Citrus* foi dada por Guerra (1993) e Carvalho *et al.* (2005), que definiram oito tipos de cromossomos encontrados nesse grupo. A partir dessas caracterizações, pode-se constatar que existe uma grande variedade de padrões de bandas entre as espécies de *Citrus*, que permitem definir com mais precisão as demais semelhanças e diferenças genéticas de cada espécie (Silva *et al.*, 2014).

As bandas heterocromáticas encontradas nos cromossomos de *Citrus* são formadas por DNA satélite, que são sequências de DNA altamente repetitivas e organizadas em tandem (Guerra, 2000). Apesar da maior parte da heterocromatina não ser codificante, alguns satélites podem apresentar sítios ativos de DNAr (DNA Ribossomal), que estão ligados a funções como transcrição, organização do nucléolo (RONs), entre outras (Pedrosa *et al.*, 2000; Guerra, 2000). Os sítios de DNAr 5s e 45s são bastante estudados e utilizados, devido a sua presença na maioria dos seres vivos e por sua ótima conservação durante a evolução (Carvalho *et al.*, 2005).

Para marcar as regiões do cromossomo que apresentam os sítios de DNAr 5s e 45s, assim como outras regiões de interesse, é usada a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente

(FISH). Primeiramente, para conseguir localizar as sequências de interesse, se faz necessário isolar o fragmento de interesse, marca-lo com uma molécula marcadora de fácil detecção. O fragmento de interesse será chamado de sonda, onde poderá ser hibridizado *in situ*, isto é, no sítio ou local do cromossomo onde essa sequência se encontra presente (para uma descrição detalhada dessa técnica ver Guerra, 2004). Em *Citrus*, a FISH têm sido utilizada para mapear os genes ribossomais 5S e 45S (Guerra, 2004) e também para localizar o DNA satélite de *Citrus* e gêneros relacionados, como a CsSat 181 (Beridze *et al*, 1992; Barros e Silva *et al*, 2010) e CL600 (De Felice *et al*, 2004). Esse tipo de análise, somada as análises de bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI, são de extrema importante para os estudos citotaxômicos que envolvem a subfamília Aurantioideae, principalmente a grupos relacionados à *Citrus*, como *Poncirus*, *Murraya* e *Fortunella* (Barros e Silva *et al.*, 2012).

INTRODUÇÃO

A heterocromatina foi considerada como “lixo genético” por muitos anos, até que estudos indicassem suas propriedades e funções no genoma. A estrutura heterocromática é basicamente composta por DNA satélites, que são sequências altamente repetitivas e organizadas em tandem, estando presentes em certas áreas do cromossomo. (Henning, 1999). A heterocromatina vem sendo usada para estudos de classificação e identificação de espécies em representantes da subfamília Aurantioidea, onde gêneros como *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* são bastante estudados a partir da distribuição dessa heterocromatina (Guerra, 1993).

Há uma grande ocorrência de híbridos interespecíficos dentro desse grupo devido a fraca barreira reprodutiva, mutações somáticas, apomixia, etc causando alta frequência de cruzamentos interespecíficos dentro do mesmo gênero e entre gêneros relacionados tornando a taxonomia e filogenia desse grupo bastante complicada e controversa (Guerra, 1993; Nicolosi *et al*, 2000). Em *Citrus* estima-se que apenas de três a seis espécies sejam de origem pura, entre elas estão *C. medica* L., *C. reticulata* Blanco, *C. maxima* (Burm.) Merrill e algumas tangerinas (Tanaka, 1977; Guerra, 2009; Mendes *et al*, 2011).

A citogenética vem sendo fundamental para compreender e caracterizar as espécies em *Citrus*, onde todas (exceto alguns cultivares poliploides) possuem o número cromossômico mitótico $2n=18$ (Guerra, 1984). Apesar de todos possuírem número cromossômico recorrente, existem características que podem indicar os seres puros e possíveis híbridos dentro desse grupo, como a distribuição de heterocromatina nos cromossomos (Guerra, 1993). Essa distribuição é observada graças as técnicas como coloração por giemsa, bandeamento C e, principalmente, por fluorocromos cromomicina A3 (CMA) e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Guerra, 2000), que gerou a classificação atual dos tipos cromossômicos presentes nas

espécies de *Citrus*, possibilitando caracterizar e diferenciar as espécies, bem como indicar quais são as espécies puras e quais são as possíveis espécies de origem híbrida (Carvalho *et al*, 2005).

Dessa forma esse trabalho objetivou analisar citogeneticamente sete acessos do gênero *Citrus* do banco de germoplasma da EMBRAPA/CNPMPF, a fim de caracterizar e diferenciar esses acessos a partir da distribuição de bandas heterocromáticas com auxílio dos fluorocromos de CMA e DAPI, bem como indicar as espécies que são possivelmente puras ou de origem híbrida.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal usado foi obtido através do banco de germoplasma da EMBRAPA/CNPMPF, em Cruz das Almas – BA, onde foram usados acessos de sete espécies de *Citrus*: *Citrus hystrix* DC., *Citrus iwaikan* hort. ex Tanaka, *Citrus kamikan*, *Citrus longispina* Wester, *Citrus natsukiu*, *Citrus taiwanica* Tan. et Shim e *Citrus webberi* Wester. As sementes desses acessos foram extraídas, manualmente, de frutos maduros, e enviadas ao laboratório de Citogenética Vegetal, no setor de Botânica do Centro de Ciências Agrárias - UFPB. As sementes foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 4% por 30 segundos. Em seguida as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com papel filtro umedecido.

Para o pré-tratamento foi usado o agente antimetabólico 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002 M por 24 horas a 10° C. Posteriormente foi feito a fixação do material com Carnoy 3:1 (três partes de álcool etílico P.A. para uma de ácido acético glacial), agitado por 30 minutos com uso do vortex, mantido em temperatura ambiente por uma hora e 30 minutos, em seguida, todas as fixações foram estocadas em freezer a -20°C. As preparações das lâminas do material fixado

foram feitas através das raízes dos acessos, onde foram deixadas em água destilada para depois serem digeridas com uma solução enzimática contendo 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v) por 25 minutos a 37°C. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em ácido acético 45%.

As melhores lâminas foram selecionadas após serem coradas com uma solução de 4',6-diamidino-2-fenilindol.2HCl (DAPI) [2 µg/ml]:glicerol (1:1, v/v), indicando as melhores lâminas. Logo após, foram coradas novamente com DAPI e com o fluorocromo cromomicina A3 (CMA).

Os cromossomos foram classificados de acordo com a metodologia de distribuição dos blocos heterocromáticos em *Citrus* (Guerra, 1993; Carvalho *et al.*, 2005), onde existem oito tipos de cromossomos: tipo A apresenta duas bandas terminais e uma proximal; tipo B apresenta uma terminal e outra proximal; Tipo C: duas terminais; Tipo D: um terminal; Tipo E: uma banda subterminal/intersticial; Tipo F: não apresenta bandas; Tipo F_L: maiores cromossomos e não apresentam bandas; Tipo G: uma terminal e uma subterminal. A figura 1 mostra o ideograma que representa os oito tipos de cromossomos encontrados em *Citrus*.

RESULTADOS

Todos os sete acessos eram diploides, apresentaram número cromossômico $2n = 18$. Após a técnica de coloração pelos fluorocromos CMA/DAPI os materiais avaliados apresentaram cromossomos com os blocos heterocromáticos CMA⁺/DAPI⁺, variando enquanto sua localização na estrutura cromossomal. Não se observou bandas DAPI⁺ em nenhum dos acessos

analisados. A tabela 1 apresenta todos os nomes das espécies analisadas e a respectiva fórmula cariotípica de cada acesso.

Todos os tipos cromossômicos foram encontrados nos acessos analisados, onde todos os acessos apresentaram heteromorfismos cromossômico, seja pelo tamanho do cromossomo ou pelo tamanho das bandas heterocromáticas. Cromossomos do tipo D e F foram evidenciados em todos os acessos e sempre apareceram em maior número nas análises, enquanto os tipos A, B, C, E e G não foram visualizados em todos os acessos e apareceram em menor número. Os tipos E e G foram localizados em três acessos (*Citrus hystrix*, *Citrus longispina* e *Citrus webberi*).

Citrus hystrix (3B + 10D + 2E + 2F + 1G) e *Citrus longispina* (3B + 10D + 1E + 3F + 1G) tiveram a fórmula cariotípica muito semelhante, apenas se diferenciando pelos números de E e F. *C. hystrix* (figura 2a-c) sempre apresentava um cromossomo do tipo E com a banda terminal fraca e/ou pequena, o confundindo-o com os tipos D ou F (asterisco na fig. 2c); além disso, em algumas células um cromossomo do tipo B apresentava sua região proximal parcialmente descondensada (seta na fig. 2c). Em *C. longispina* (figura 2d-f) havia um D que apresentava banda fraca (asterisco na fig. 2f) e um cromossomo que hora se parecia com E, mas na verdade era o tipo G (interseção na fig. 2f). O acesso de *Citrus webberi* (14D + 1E + 2F + 1G) se assemelha com os dois anteriores por apresentar os tipos E e G; *C. webberi* (figura 2g-i) apresentou dois cromossomos do tipo D que apresentam bandas terminais fracas, onde uma era quase imperceptível (asteriscos na fig. 2i). Além disso, em algumas células o cromossomo tipo D exibia a banda terminal parcialmente descondensada (seta na fig. 2i).

Citrus iwaikan (1A + 1B + 1C + 9D + 5F + 1F_L) e *Citrus kamikan* (1A + 1B + 3C + 8D + 5F) apresentaram a fórmula cariotípica um pouco semelhante, se distinguindo pelas quantidades de cromossomos tipo C e D, e pela presença de um F_L. Em *C. iwaikan* (figura 3a-c) houve um D que exibia a banda terminal muito fraca (asterisco na fig. 3c), um F_L que podia

ser confundido com o tipo D ou F (seta menor na fig. 3c) e um cromossomo do tipo A que apresentava a região proximal parcialmente descondensada (seta na fig. 3c). Em *C. kamikan* (figura 3d-f) sempre mostrava dois cromossomos do tipo D que apresentavam as bandas terminais bem fracas (asteriscos na fig. 3f); além disso, em algumas situações durante as análises, um cromossomo do tipo C se parecia muito com um do tipo A (interseção na fig. 3f).

Citrus natsukiu ($2A + 1C + 8D + 7F$) mostrou uma variação em sua fórmula em algumas células, devido as pequenas bandas terminais em alguns cromossomos descondensados, fazendo com que o número de cromossomos D e F variassem um pouco. Entretanto, *C. natsukiu* (figura 3g-i) apresentou em todas as células analisadas um cromossomo do tipo D com bandas terminais fracas (asterisco na fig. 3i) e um cromossomo do tipo A com a região proximal parcialmente descondensada (seta na fig. 3i). *Citrus taiwanica* ($2B + 1C + 10D + 4F + 1FL$) também mostrou uma pequena variação em sua fórmula em diferentes células por conta de bandas fracas de cromossomos; porém, o padrão mais recorrente e confiável em *C. taiwanica* (figura 3j-l) mostrou a ocorrência de dois cromossomos do tipo D que exibiam constantemente bandas mais fracamente coradas em relação aos outros cromossomos do tipo D (asteriscos na fig. 3l) e a presença de um cromossomo do tipo FL.

DISCUSSÃO

Todos os acessos apresentaram o número diploide recorrente de $2n = 18$ (Guerra, 1984), bem como o padrão de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI, foram observados descrito por Guerra (1993).

Todos os acessos apresentaram heteromorfismo de bandas heterocromáticas CMA⁺ pela diferença no tamanho e intensidade em um ou mais cromossomos do mesmo tipo, como mostra as figuras 2 e 3. Esse heteromorfismo pode ser explicado pela evolução de sequências repetidas em tandem (DNAsat), que compõe a heterocromatina desses possíveis híbridos, associadas a mecanismos moleculares que resultam em processos genéticos como mutações, crossing-over desigual, conversão de genes, ampliações de sequências repetitivas, etc (Smith, 1976; Stephan, 1989; Mehrotra & Goyal, 2014).

Cromossomos com regiões parcialmente descondensadas foram comumente encontradas nos acessos de *C. hystrix*, *C. iwaikan*, *C. natsukiu* e *C. webberi* (setas maiores nas figuras 2c, 3c, 3i e 2i). Houve uma preferência na ativação dessas regiões em apenas um cromossomo em cada acesso, onde *C. hystrix* que teve apenas um cromossomo B com a região proximal, *C. iwaikan* e *C. natsukiu* em um cromossomo do tipo A na região proximal e *C. webberi* em apenas um dos cromossomos D com a região terminal. As sequências de heterocromatina que formam essas regiões geralmente estão ligadas a regiões organizadoras do nucléolo (RONS), com genes ativos de DNAr 5S e 45S (Pedrosa *et al.*, 2000; Moraes, 2007; Barros e Silva *et al.*, 2010). A ativação preferencial de cada cromossomo pode indicar que nessas regiões, onde a heterocromatina está parcialmente descondensada, podem haver sítios ativos de transcrição que exercem uma função específica durante o ciclo mitótico (Milhomem *et al.*, 2013).

Em trabalhos de revisão, como de Guerra (2009), os tipos E, G e F_L não são encontrados nas espécies puras de *Citrus*, mas foram encontrados em alguns acessos analisados neste trabalho: tipo E e G em *C. hystrix*, *C. longispina* e *C. webberi*, e tipo F_L em *C. iwaikan* e *C. taiwanica*. O tipo F_L apareceu em algumas células de outros acessos, entretanto sua classificação foi relativamente inviável, pois em algumas células os cromossomos não estavam com o nível de condensação ideal, o que induziu a classifica-los como D ou F erroneamente.

Esses tipos de cromossomos podem indicar que esses possíveis híbridos acumularam diferenças na heterocromática durante sua evolução, a ponto de “criar” os tipos E, G e F_L (Cornélio *et al*, 2003; Carvalho *et al*, 2005; Moraes *et al*, 2007).

A análise da distribuição de bandas CMA⁺ indica que todos os acessos analisados são possivelmente de origem híbrida, pois há uma heterogeneidade nos padrões de bandas, onde há falta de pares cromossomos homólogos dentro da fórmula cariotípica de cada acesso, o que já foi visto em trabalhos anteriores com outras espécies de origem híbrida (Guerra, 1993; Guerra, 2000; Cornélio, 2003; Carvalho *et al*, 2005). Entretanto análises através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com outros marcadores citotaxonômicos são necessárias para confirmar essa hipótese (Guerra, 2009).

Com as análises de bandeamento CMA/DAPI foi possível identificar, caracterizar e detalhar cada acesso a partir da distribuição de bandas heterocromáticas ricas em GC (CMA⁺/DAPI), as quais mostraram que todos os acessos são possivelmente de origem híbrida e que são ótimos modelos para estudos evolutivos dentro do grupo *Citrus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVRAMOVA, Z. V., 2002, Heterochromatin in Animals and Plants: Similarities and Differences. *Plant Physiol*, Vol 129, p. 40-49.

BARROS E SILVA, A. E.; MARQUERS, A.; SANTOS, G. B.; GUERRA, M., 2010, The Evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Springer Science+Business Media B.V.* p. 503-514.

BARROS E SILVA, A.E.; SOARES FILHO, W.S.; GUERRA, M., 2012, Linked 5S and 45S rDNA Are Highly Conserved through the Subfamily Aurantioideae (Rutaceae). *Cytogenetic and Genome Res*, vol. 140, p. 62-69.

BROWN, S. W., 1966, Heterochromatin: Heterochromatin provides a visible guide to suppression of gene action during development and evolution. *Science*, vol. 151, p. 417-425.

CARVALHO, R., SOARES FILHO, W. S., BRASILEIRO-VIDAL, A. C., GUERRA, M., 2005, The Relationships Among Lemons, Limes, and Citron: A Chromosomal Comparison. *Cytogenetic and Genome Research*. p. 277 - 281.

CARPENTER, J. B., AND P. C. REECE., 1969, Catalog of genera, species, and subordinate taxa in the orange subfamily Aurantioideae (Rutaceae). Crops Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture Beltsville, Maryland USA.

CHANG, K., 1992, The evaluation of citrus demand and supply. *Proc. Int. Soc. Citric. Italy*, Vol. 3, 1153-1155.

CHENG, Y.M; LIN, B.Y., 2003, Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics* 164: 299-310

CREASEY, K. M.; MARTIENSSEN, R.A., 2010, Germline Reprogramming of Heterochromatin in Plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 75, p. 269-274.

ENGLER, A., 1931, Rutaceae. In: ENGLER, A. & PRANTL, K. (Ed.). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 2 ed. Leipzig: Engelmann,. v.19a: 187-359.

- FILATOVA, I.A.; AND KOLESNOVA, Y., 1999, The significance of flavonoids from citrus juices in disease prevention. *Pishchevaya Promyshlennost* 8, 62-63.
- GUERRA, M., 1982, O Uso de Giemsa Na Citogenética Vegetal - Comparação Entre a Coloração Simples e o Bandamento. *Comunicações*.
- GUERRA, M., 1983, New Chromosome Numbers in Rutaceae I. *Plant Systematics and Evolution*. v. 146, p. 13 – 30.
- GUERRA, M., 1985, Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin Patterns. *Caryologia*. Vol. 38, n. 3-4: 335-346.
- GUERRA, M., 1993, High amount of heterochromatin in a tropical tree species: *Genipa americana* L. (Rutaceae). *Cytologia, Piza*, v. 58, p. 427-442.
- GUERRA, M., 1988, *Introdução à Citogenética*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S.A., 144 p.
- GUERRA, M., DOS SANTOS, K. G. B., BARROS E SILVA, A. E., EHRENDORFER, F., 2000, Heterochromatin Banding Patterns In Rutaceae-Aurantioideae—A Case Of Parallel Chromosomal Evolution, *American Journal of Botany* 87(5): 735–747.
- GUERRA, M., 2004, Hibridização in situ: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.) *FISH – Conceitos e aplicações na citogenética*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 1-32.
- GUERRA, M., 2009, Chromosomal variability and the origin of Citrus species. In: Mahoney CL, Springer DA (eds) *Genetics diversity*. Nova Science, New York, pp 51–68.
- HEITZ, E., 1928, Das Heterochromatin der Moose. I. *Jahrb Wiss Bot* 69:762-818.
- HENNING, W., 1999 Heterochromatin. *Chromosoma*. Vol. 108, p. 1-9.
- HYNNIEWTA, M.; MALIK, S.K.; RAO, S.R., 2014, Genetic diversity and phylogenetic analysis of Citrus (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. *Metagene*, v. 2, p. 237-251.
- JAMILENA, M; RUIZ REJON, C, 1994, A molecular analysis of oring of the *Crepis capillaris* B chromosome. *Jurnal of Cell Science* 107: 703-708.
- LADANIYA, M.S., 2008, *Citrus Fruit: Biology, Tecnology and Evoluotion*. Elsevier Inc., 354 p.

LIM, K.Y; KOVARIK A.; MATYASEK, R.; CHASE, M.W.; KNAPP, S; MCCARTHY, E; CLARKSON, J.J; LEITCH, A.R., 2006, Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. *Plant J* 48:907–919.

MENDES, S.; MORAES, A. P.; MIRKOV, T. E.; PEDROSA-HARAND, A., 2011, Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus L.* and *Poncirus Raf.* as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Res* 19:521–530

MEHROTRA, S., GOYAL, V., 2014, Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12 164–171

MILHOMEM1, S. S. R., SCACCHETTI P. C., PIECZARKA, J. C., FERGUSON-SMITH, M. A., PANSONATO-ALVES, J. C., O'BRIEN, P. C. M., FORESTI, F., NAGAMACHI1, C. Y., 2013, Are NORs Always Located on Homeologous Chromosomes? A FISH Investigation with rDNA and Whole Chromosome Probes in *Gymnotus* Fishes (Gymnotiformes). *PLOS ONE*, Volume 8, Issue 2.

MINISTERIO DA AGRICULTURA DO BRASIL - CITROS., 2017, Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>>.

MORAES, A.P; LEMOS, R.R; BRASILEIRO-VIDAL, A.C; SOARES FILHO, W.S; GUERRA M., 2007, Chromosomal markers distinguish hybrid and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* v. 119, p. 275-181.

NEVES, N; DELGADO, M; SILVA, M; CAPERTA, A; MORAIS-CECÍLIO, L; VIEGAS, W., 2005, Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res*, vol. 109, p. 104-111.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; MALFA, S.L.; CIOTINELLA, G.; TRIBULATO, E., 2000, Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 1155–1166.

PARDUE, M. L.; HENNING, W., 1990, Heterochromatin: junk or collectors item?. *Chromosoma*, vol. 100, p. 3-7.

PARK, Y.; KURODA, M.I., 2001, Epigenetic Aspects of X-Chromosome Dosage Compensation. *Science*, vol. 293, p. 1083-1085.

PEDROSA, A., SCHWEIZER, A., GUERRA, M., 2000, Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet* 100:361–367

SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M. W.; GREGER, H., 2001, Phylogenetic analysis of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biology*, New York, v. 3, p.77-87.

SILVA, C.S.; MENDES, S.; SOARES FILHO, W.S; PEDROSA-HARAND, A., 2015, Chromosome homologies between *Citrus* and *Poncirus*: The comparative cytogenetic map of mandarin (*Citrus reticulata*). *Tree Genetics & Genomes* 11:811, p. 1-9.

SMITH, G.P., 1976, Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. Volume 191, Issue 4227, Pages 528-535.

STEPHAN, W., 1989, Tandem-repetitive noncoding DNA: Forms and forces. Volume 6, Issue 2, Pages 198-212.

TANAKA, T., 1977, Fundamental discussion of Citrus classification. *Study in Citrologia*, v.14, p.1-6.

WEBBER, H.J: 1967. History and development of the Citrus industry. In: Webber, H.J., Batchelor, D.L. (Eds.), *The Citrus Industry*, vol I. University of California, Berkeley, pp. 1–39.

WEBBER, H. J.; L.D. BATCHELOR (eds.). 1943. *The citrus industry*. Vol. 1. History, botany, and breeding. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, 1028 pp.

XIN LU, L., 2001, China's citrus production: retrospect, present situation and future prospects. *Proc. China - FAO Citrus Symp.*, May 2001, 151-165.

SWINGLE, W. T., AND P. C. REECE. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In W. Reuther, H. J. Weber and L. D. Batchelor [eds.], *The Citrus industry*, vol. I, History, world distribution, botany and varieties 190–430. University of California Press, Berkeley, California, USA.

TABELAS

ACESSOS ANÁLISADOS DE <i>CITRUS</i>	FÓRMULA CAROTÍPICA
<i>Citrus hystrix</i> DC	3B + 10D + 2E + 2F + 1G
<i>Citrus iwaikan</i> hort. Ex Tanaka	1A + 1B + 1C + 9D + 5F + 1FL
<i>Citrus kamikan</i>	1A + 1B + 3C + 8D + 5F
<i>Citrus longispina</i> Wester	3B + 10D + 1E + 3F + 1G
<i>Citrus natsukiu</i>	2A + 1C + 8D + 7F
<i>Citrus taiwanica</i> Tan. et Shim	2B + 1C + 10D + 4F + 1FL
<i>Citrus webberi</i> Wester	14D + 1E + 2F + 1G

Tabela 1. Tabela com o nome das espécies analisadas e com suas respectivas fórmulas cariotípicas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ideograma que representa os oito tipos de cromossomos encontrados nas espécies de *Citrus*. **p.30**

Figura 2 - Prancha das células mitóticas coradas com CMA/DAPI de *Citrus hystrix* DC (1a-c), *Citrus longispina* Wester (1d-f) e *Citrus webberi* Wester (1g-i). **p.31**

Figura 3 - Prancha das células mitóticas coradas com CMA/DAPI de *Citrus iwaikan* hort. Ex tanaka (2a-c), *Citrus kamikan* (2d-f), *Citrus natsukiu* (2g-i) e *Citrus taiwanica* Tan. et Shim (2j-l). **p. 32**

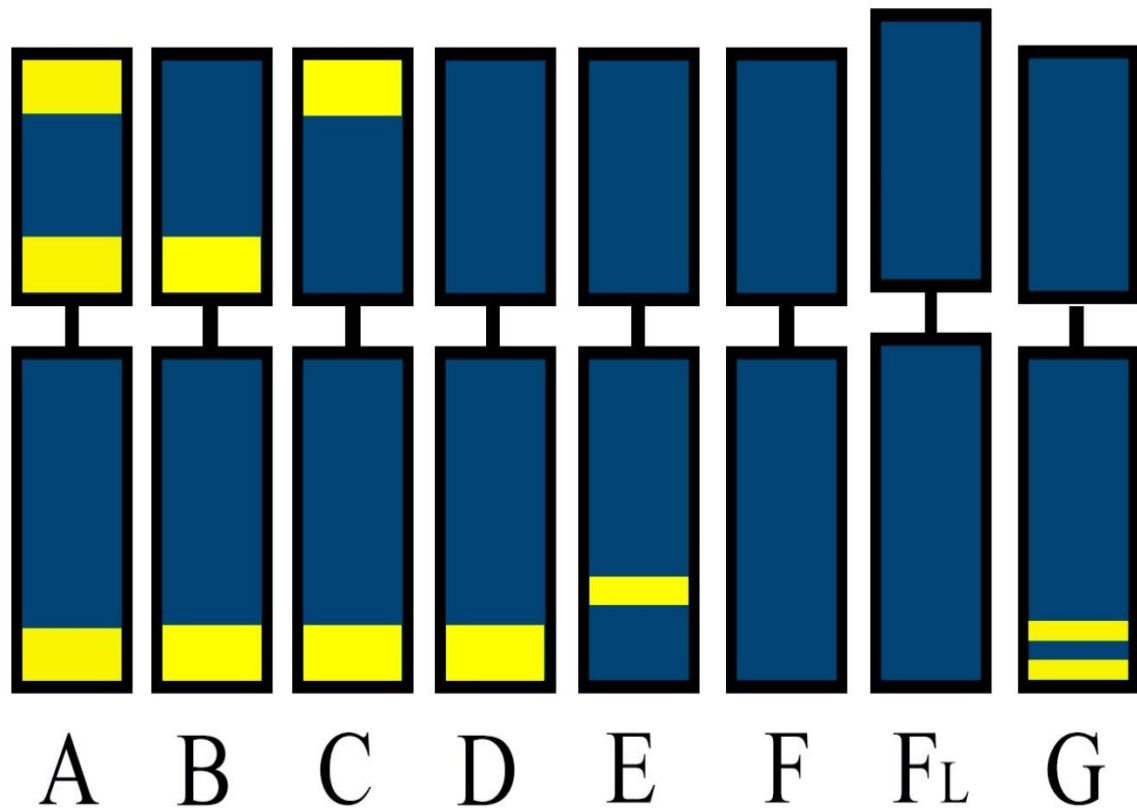
FIGURAS

Figura 1. Ideograma que representa os oito tipos de cromossomos encontrados nas espécies de *Citrus*

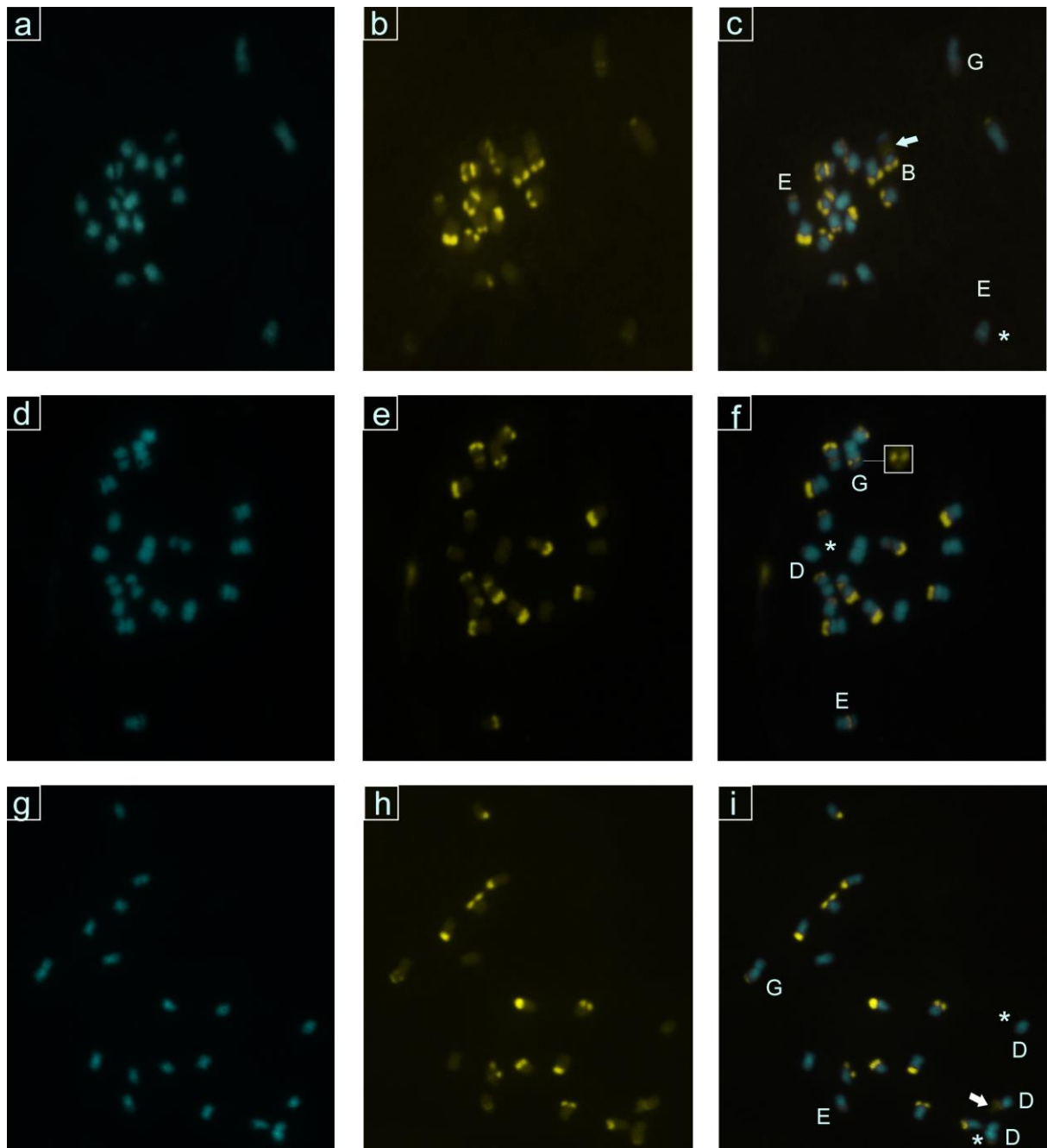


Figura 2. Prancha das células mitóticas coradas com CMA/DAPI de *Citrus hystrix* DC (1a-c), *Citrus longispina* Wester (1d-f) e *Citrus webberi* Wester (1g-i)

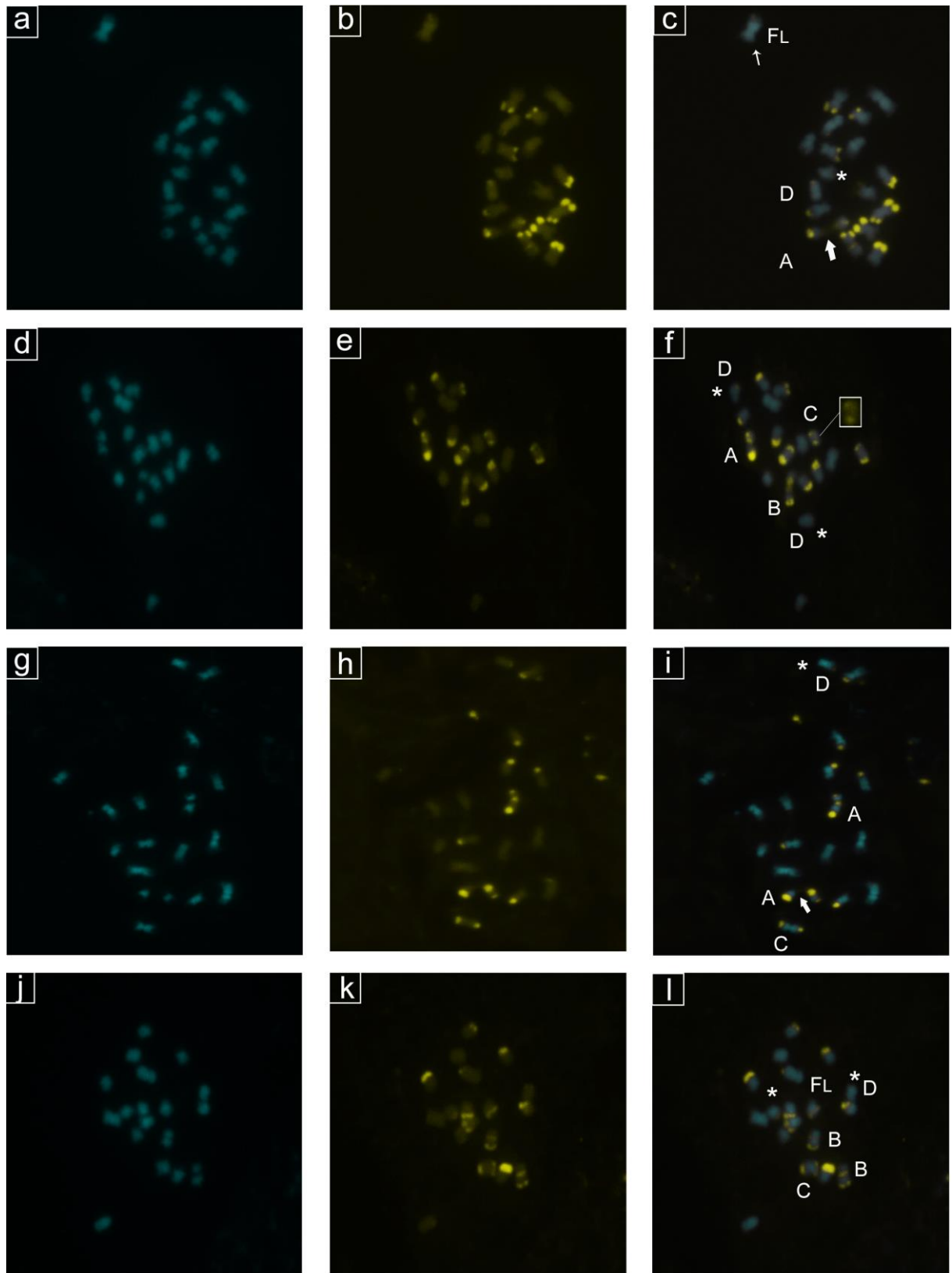


Figura 3. Prancha das células mitóticas coradas com CMA/DAPI de *Citrus iwaikan* hort. Ex tanaka (2a-c), *Citrus kamikan* (2d-f), *Citrus natsukiu* (2g-i) e *Citrus taiwanica* Tan. et Shim (2j-l)